

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-319580

(43)Date of publication of application : 22.11.1994

(51)Int.Cl.

C12P 19/26  
C12N 1/20  
//(C12P 19/26  
C12R 1:46 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:46 )

(21)Application number : 06-077048

(71)Applicant : LUCKY CO LTD

(22)Date of filing : 15.04.1994

(72)Inventor : PARK MYOUNG GYU  
JANG JAE DEOG  
KANG WHAN KOO

(30)Priority

Priority number : 93 9306423  
93 9306424

Priority date : 16.04.1993  
16.04.1993

Priority country : KR  
KR

(54) STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS MEDIUM AND PROCESS FOR PREPARING  
HYALURONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a hyaluronic acid of high molecular weight, a new microorganism that can produce the hyaluronic acid, the production process of hyaluronic acid using the same and the culture medium therefor.

CONSTITUTION: A strain of Streptococcus zooepidemicus LBF707 (KCTC 0075BPA), a mutant that can produce hyaluronic acid of high molecular weight because it is defective in hemolysis and hyaluronidase activity, a production process of hyaluronic acid using the same, and a culture medium to be used therefor are provided.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 15.04.1994

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2547965

[Date of registration] 08.08.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-319580

(43) 公開日 平成6年(1994)11月22日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
// (C 1 2 P 19/26				
C 1 2 R 1:46)				
(C 1 2 N 1/20				

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-77048	(71) 出願人	591045002 株式会社ラッキー 大韓民国150-010ソウル、ヨンドンボグ、 ヨイドドン20番
(22) 出願日	平成6年(1994)4月15日	(72) 発明者	パク・ミョンギョ 大韓民国デジョン、ユソング、ドリョンド ン381-42番 ラッキー・アパートメント 7-204
(31) 優先権主張番号	1 9 9 3 - 6 4 2 3	(72) 発明者	チャン・ジェドク 大韓民国デジョン、ユソング、ドリョンド ン381-42番 ラッキー・アパートメント 1-304
(32) 優先日	1993年4月16日	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(33) 優先権主張国	韓国 (K R)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	1 9 9 3 - 6 4 2 4		
(32) 優先日	1993年4月16日		
(33) 優先権主張国	韓国 (K R)		

(54) 【発明の名称】 新規ストレプトコッカス属菌株およびそれを用いるヒアルロン酸の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は高分子量のヒアルロン酸およびそれを産生することができる新規微生物、これを用いた高分子量ヒアルロン酸の産生方法およびそれに使用する培地を提供するものである。

【構成】 溶血性およびヒアルロニダーゼ活性を欠く高分子量ヒアルロン酸高産生能を有する突然変異株であるストレプトコッカス・ズウエピデミカス L B F 7 0 7 (K C T C 0 0 7 5 B P)、この菌株を使用するヒアルロン酸の産生方法およびこれに用いられる培地。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 溶血性およびヒアルロニダーゼ活性を欠く高分子量ヒアルロン酸高産生能を有するストレプトコッカス・ズウエビデミカス変異株。

【請求項2】 高分子量ヒアルロン酸高産生能を有する突然変異株であるストレプトコッカス・ズウエビデミカスLBF707 (KCTC 0075BP)。

【請求項3】 請求項1または2記載の変異株を培養することを含むヒアルロン酸の製造方法。

【請求項4】 ウリジンを添加した培地中でストレプトコッカス属微生物またはその変異株を培養することを含む高分子量ヒアルロン酸の大量生産方法。

【請求項5】 前記変異株がストレプトコッカス・ズウエビデミカスLBF707 (KCTC 0075BP) である、請求項4記載の方法。

【請求項6】 ウリジンの濃度が0.1～5.0g/lである、請求項4または請求項5記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は高分子量ヒアルロン酸(Hyaluronic acid=HA)の産生可能な新規ストレプトコッカス属菌株、これを用いた高分子量のヒアルロン酸の産生方法およびこのヒアルロン酸を産生する菌株培養のための培地に関するものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ヒアルロン酸は分子量5万～1,300万ダルトンの直鎖の多糖類で、無色透明な高粘度の溶液となり、繰返し単位のグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンを交互にB-1,3とB-1,4で直鎖状に結合したものとされている。ヒアルロン酸およびその塩は、例えば、眼科手術時の硝子体代替物、点眼製剤および化粧品の保湿剤のような多様な用途を有する。一般的に、ヒアルロン酸は動物の組織または特定の微生物の培養液から抽出することによって製造される。例えば、動物の組織からヒアルロン酸を抽出する方法がバラズ(Balaz)の米国特許第4,141,973号に記載されている。

【0003】 動物の組織から抽出によりヒアルロン酸を産生する方法では、組織内のコンドロイチン硫酸とグリコサミノグリカンなどの生体高分子不純物を除去するための複雑な精製工程が必要であり非経済的であるという欠点があるので、大量生産には適さない。これに対して、微生物を用いるヒアルロン酸の産生方法は相対的に生産費が低く、比較的簡単な精製工程により高分子量のヒアルロン酸が高収率で得られることが知られている(バラズの米国特許第4,141,973号、アカサカ(Akasaka)の日本国特開昭58-056692号、ニムロド(Nimrod)の米国特許公開第86-00066号参照)。

【0004】 これまで、ヒアルロン酸の産生可能な微生物としてストレプトコッカス属菌株が知られている。ヒ

アルロン酸の産生に使用されてきたストレプトコッカス属の菌株にはストレプトコッカス・ピオゲネス(*S. pyogenes*)、ストレプトコッカス・フェカリス(*S. faecalis*)、ストレプトコッカス・ディスガラクチエ(*S. dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ズウエビデミカス(*S. zooepidemicus*)、ストレプトコッカス・エクイ(*S. equi*)、ストレプトコッカス・エクイシミリリス(*S. equisimilis*)等があり、これらはバギス便覧(Bergey's Manual)によればランズフィールド血清群AまたはC型に分類されており、一般的に、β溶血作用を有する連鎖球菌であると報告されている。日本国特開昭58-56692および昭60-500997号、大韓民国特許公告第92-9494号および大韓民国特許公開第87-11252号などには、ストレプトコッカス属の菌株を用いるヒアルロン酸の産生方法が開示されている。

【0005】 また、例えば、リン酸塩の濃度調節による方法(大韓民国特許公告第90-5774号)、ビルビン酸塩、グルコサミンなどを用いる方法(日本国特開昭62-257901号)、少なくとも1種以上のヒドロキシラジカルを有する芳香族化合物を用いる方法(日本国特開平1-225491号)、およびアルギニンおよびグルタミン酸を使用する方法(日本国特開昭63-141594、および昭62-289198)などのようにストレプトコッカス属菌株によるヒアルロン酸の産生を増大させる方法も報告されている。

【0006】 しかしながら、前記の先行技術では、平均分子量が300～2,500キロダルトンの比較的低分子量のヒアルロン酸が産生され、その収率も低いという欠点がある。したがって、そのようにして得られた低分子量のヒアルロン酸は化粧品用としては保湿作用が不充分であるだけでなく眼科手術時の補助剤または関節炎治療剤として使用するには品質が劣る。

【0007】 本発明者らはこのような課題を解決するために研究を重ねた結果、ストレプトコッカス・ズウエビデミカスから得られた突然変異体が高分子量のヒアルロン酸を大量生産し得ることを見出した。さらに、前記菌株を含むストレプトコッカス属の菌株を培養してヒアルロン酸を産生する際、培地にウリジンを添加することによって高分子量のヒアルロン酸を大量生産できることも見出した。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明の目的は、高分子量のヒアルロン酸を産生を可能とし、ヒアルロニダーゼ活性および溶血性の全くないストレプトコッカス属の突然変異菌株を提供することである。

【0009】 本発明の他の目的は、前記菌株を培養して高分子量のヒアルロン酸を産生する方法を提供することである。

【0010】 本発明のもう一つの目的は、ヒアルロン酸の分子量を増大させ、生産性を向上させるための前記菌

株の培養に適切な培地を提供することである。

【0011】本発明を詳細に説明すれば、次の通りである。本発明は溶血性およびヒアルロニダーゼ活性を欠く高分子量ヒアルロン酸高産生能を有するストレプトコッカス・ズウエピデミカス変異株に関するものであり、より詳しくは、ストレプトコッカス・ズウエピデミカス(*Streptococcus zooepidemicus*; ATCC 35246)にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを加えて突然変異を誘発させる工程を3回以上繰り返し、ついで溶血性およびヒアルロニダーゼ活性を欠く菌株をスクリーニングすることを含む方法によって得られる、高分子量ヒアルロン酸高産生能を有するストレプトコッカス・ズウエピデミカス変異株に関する。

【0012】上述のストレプトコッカス属突然変異株は公知のストレプトコッカス・ズウエピデミカス(ATCC 35246)の突然変異により得ることができる。突然変異の誘発方法は少なくとも3回のN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)処理を含み、例えば、本発明では1次NTG処理後、溶血性のない菌株を選別した後、選別された菌株を2次NTG処理してヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼ活性のない菌株を選別する。ついで、選別された菌株を再び3次NTG処理した後、平板培地の上で培養して、成長が早く粘性が高く大きいコロニーを選別してヒアルロン酸の生産性に優れた変異株を得た。

【0013】こうして選別された突然変異株はヒアルロニダーゼを生成せず、溶血作用を有しないだけでなく、平均分子量3,500キログルトン以上の非常に高い分子量を有するヒアルロン酸を産生する。前記変異株中の一つは、細菌学的な特性に基づいて「ストレプトコッカス・ズウエピデミカスLBF707」と命名され、1993年1月29日付でブダペスト条約下の国際寄託機関である韓国遺伝子銀行(KCTC)に受託番号KCTC 0075BPとして寄託された。

【0014】一般的に、微生物の培養のための培地の成分には炭素源、窒素源、無機塩類のような微量元素などが含まれる。炭素源としては澱粉、グルコース、スクロース、ガラクトース、フルクトースなど、好ましくは、グルコースが挙げられる。窒素源としては硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、カサミノ酸、酵母エキス、ペプトン、トリプトンなどを使用することができる。また、場合によって、塩化ナトリウム、第一リン酸または第二リン酸ナトリウム、硫酸第一鉄、塩化カリウム、硫酸マグネシウムなどを使用し得る。

【0015】本発明では、前記成分の培地にウリジンを添加してストレプトコッカス属のヒアルロン酸産生可能な菌株を培養することによってヒアルロン酸の産生収率を高める。ウリジンは極めて少量であっても培地に含まれるならば効果を発揮するが、少量すぎる場合は効果が微弱であり、過剰量の場合は非経済的なのでウリジンの

添加量は、好ましくは0.1~5.0g/lである。したがって、本発明の培地は培養液1l当たり10~100gのグルコース、0.5~3.0gの硫酸マグネシウム、1.0~5.0gの第一リン酸カリウム、1.0~10.0gの酵母エキス、10.0~20.0gの酵母ペプトンおよび0.1g~5.0gのウリジンを含むことができ、好ましくは、培地の組成は培養液1l当たり50~70gのグルコース、0.7~1.5gの硫酸マグネシウム、1.5~2.5gの第一リン酸カリウム、4.0~6.0gの酵母エキス、13.0~17.0gの酵母ペプトンおよび0.5~1.0gのウリジンからなる。

【0016】なお、本発明のストレプトコッカス・ズウエピデミカスLBF707を含めてストレプトコッカス属の菌株を前記組成の培地でヒアルロン酸の産生のための最適条件下に培養することによってヒアルロン酸の産生収率および分子量を増大させることができる。例えば、培養液のpHを7.0~7.5に調整し、33℃~38℃で0.1~1.0VVMの通気速度を保持しながら好気培養することが好ましい。培養後培地中に存在するヒアルロン酸は通常、塩、例えばナトリウム塩の形態を有する。培養の終了後、培養液中に存在するヒアルロン酸は、公知の多糖類分離精製法〔アカサカヒノデド、ジャーナル・オブ・ソサイエティ・オブ・コスメティック・ケミスト・ジャパン(J. Soc. Cosmet. Chem. Japan)、22,988〕によって回収する。

【0017】本発明の突然変異株によるヒアルロン酸の産生量は2.5~6.0g/lであり、平均分子量は3,500キログルトン以上である。ヒアルロン酸の定量はカルバゾール方法〔Z. ジッシュ、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、167,189(1947)〕によって行う。分子量の測定は高速液体クロマトグラフィー法および粘度測定により実施する。高速液体クロマトグラフィー法はポリエチレンオキシドを標準物質として使用して標準曲線を求めた後、同一条件でヒアルロン酸を溶出して分子量を確認する〔P.チャムブレク、クロマトグラフィア(Chromatographia)、30,201-204(1990)；ナルリン・B.ピーティ、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、147,387-395(1985)；ノリコ・モトハシ、ジャーナル・オブ・クロマトグラフィ(J. Chromat.)、299,508-512(1984)〕。粘度測定法は順次希釈されたヒアルロン酸溶液の固有粘度を粘度計で測定し、ヒアルロン酸の濃度について曲線を作成する。ヒアルロン酸の濃度が0の時の固有粘度を示す極限固有粘度を補外法によって求めた後、ヒアルロン酸の分子量をナルリン〔ナルリン、アナリティカル・ケミストリー(Analytical Biochemistry)、147,347-395(1985)〕の関係式：  
極限固有粘度(Limited Intrinsic Viscosity)=0.000356 x MW exp (1.0699)によって算

出する。

#### 【0018】

【実施例】下記実施例は、本発明を、より具体的に説明するもので、本発明を限定するものではない。

#### 実施例1：突然変異株のスクリーニング

##### 工程1) 溶血性のない菌株の獲得

公知の菌株であるストレプトコッカス・ズウェビデミカス(ATCC 35246)を25mlのトッド・ヒューイット培地(Todd-Hewitt培地, Difco, USA, 商品番号0492-05-0)に接種して、37℃で14時間振盪培養した後、培養液2.5mlを再び25mlのトッド・ヒューイット培地に接種して、37℃で指数増殖期に達するまで振盪培養した。培養後、培養液1ml 4℃で遠心分離(5,000xg 5分)し、沈殿した細胞を採取し、これをトリス-マレイン酸塩緩衝液(1l当たりトリス6g、pH6.0、マレイン酸 5.8g、硫酸アンモニウム1g、硫酸第一鉄0.25mg、硫酸マグネシウム0.1g、硝酸カルシウム0.005g)1mlずつ使用して2回洗浄した。洗浄した細胞を前記緩衝液1mlに懸濁した後、100~200μg/lのNTGを添加し37℃で20~30分間振盪させるか、または60~120分間静置させて突然変異を誘発させた。

【0019】NTGで処理された細胞懸濁液を4℃(5,000xg 5分)で遠心分離し、沈殿した細胞を採取し、前記緩衝液で数回洗浄して残留NTGを除去した。細胞ペレットをさらに前記緩衝液1mlに懸濁した後、そのうちの1mlを25mlのトッド・ヒューイット培養液に接種し37℃で18時間振盪培養して生存可能な突然変異細胞の数を増加させた。この時、得られた培養液を生理食塩水で適当に希釈して5%血液を含むトッド・ヒューイット寒天培地上に塗抹した後、37℃で48時間培養した。溶血性のあるコロニーはその周囲に透明域を形成するので、透明域のないコロニーを溶血性のない突然変異コロニーとして選別した。

##### 【0020】工程2) ヒアルロニダーゼを産生しない菌株の獲得

前記工程1から得られた溶血性のない突然変異株を前記工程1と同一な方法で突然変異を誘発させた後コロニーを生理食塩水に懸濁させて培養液1ml当たり400μgのヒアルロン酸と1%のアルブミン画分V(シグマ社製、商品番号A-2153)を含有するトッド・ヒューイット寒天培地上に塗抹した。この平板を37℃の温室で2~5日間静置培養した後、ここに約10mlの2N酢酸塩溶液を加えて10分間放置した。酢酸塩溶液中でヒアルロン酸とアルブミンが結合して沈澱物を形成し、培地が不透明になる。ヒアルロニダーゼ-産生コロニーの場合に、ヒアルロン酸の分解によってコロニー周囲に透明な領域が形成される。したがって、不透明な周辺部を有するコロニーをヒアルロニダーゼを産生しない突然変異株として選別した。

##### 【0021】工程3) ヒアルロン酸の産生性に優れた突然変異株の獲得

前記工程2から得られた突然変異株を前記工程1と同一な方法で突然変異を誘発させた後、得られたコロニーを生理食塩水で希釈してトッド・ヒューイット寒天培地上に塗抹した後、37℃の温室で48時間放置培養した。この時、対照群としてストレプトコッカス・ズウェビデミカス(ATCC 35246)を使用した。対照群より粘液性が高く、コロニーの大きさが大きいコロニーをヒアルロン酸の産生性に優れた突然変異株として選別した。

##### 【0022】工程4) 高分子量のヒアルロン酸産生菌株の獲得

前記工程3から得られた突然変異株から高分子量のヒアルロン酸を産生する所期の菌株を選別するために次のようなスクリーニング工程を行った。トッド・ヒューイット培地3gを150mlの蒸留水に溶かして121℃で15分間殺菌した後、各変異株を接種し37℃で15時間種培養した。主培養のために5l発酵槽に培養液1l当たり60gのグルコース、1.0gの硫酸マグネシウム、2.0gの第一リン酸カリウム、5.0gの酵母エキス、15.0gの酵母ペプトンおよび0.75gのウリジンを含む培養液3lを注入した。前記培地を121℃で20分間高圧蒸気殺菌した後、ここに変異株種培養液150mlを加えてpH7.1、温度35℃、通気速度0.5vvmを保持しながら24時間好気培養した。培養液を回収して0.45μmのフィルターを通して濾過した後、濾液を高速液体クロマトグラフィーした後、もっとも早く溶出されるヒアルロン酸を産生する菌株を選別しストレプトコッカス・ズウェビデミカス(ATCC 35246)により産生されたヒアルロン酸より高分子量のヒアルロン酸を産生する突然変異菌株を得た。この突然変異株によって産生されたヒアルロン酸は平均分子量が3,500キログルトン以上で測定された。

##### 【0023】段階5) 突然変異株の細菌学的特性

前記のような方法で得られた突然変異株は下記の細菌学的特性を示した。

・グラム染色	: 陽性
・10℃にての成長	: 陰性
・45℃にての成長	: 陰性
・6.5%食塩水での成長	: 陰性
・pH9.6での成長	: 陰性
・40%胆汁での成長	: 陰性
・アルギニン分解性	: 陽性
・馬尿酸塩分解性	: 陰性
・エスクリン分解性	: 陰性
・バシトラシン耐性	: 陰性
・糖分解性	グルコース、マルトース、スクロース、ソルビトール、ラクトース: 陽性
マンニトール、グリセリン、トレハロース	: 陰性

前記の変異株は、溶血性とヒアルロニダーゼ活性の欠如を除いて、細菌学のパーギス便覧 [Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1974] に示されたストレプトコッカス・ズウエビデミカスと同一な特性を有するので、前記の突然変異株を「ストレプトコッカス・ズウエビデミカスLBF707」と命名した。

#### 【0024】比較例1 ヒアルロン酸収率の比較

前記実施例1の工程4から得られた突然変異株ストレプトコッカス・ズウエビデミカスLBF707とストレプトコッカス・ズウエビデミカス(ATCC 35246) 10により産生されたヒアルロン酸の収率を比較した(図1)。前記突然変異株による発酵単位体積当りヒアルロン酸の収率はストレプトコッカス・ズウエビデミカス(ATCC 35246)によるものよりも20%程度増加した。

#### 【0025】比較例2 分子量の比較

前記の突然変異株による発酵液と公知菌株のATCC 35246による発酵液から単離されたヒアルロン酸の分子量を高速液体クロマトグラフィー法によって動物の組織から抽出された現在市販中のヒアルロン酸製品、例 20例えば、ヒルロン(HEALON)(Lot. No. RH41401, Pharmacia AB, Sweden)、アルツ(ARTZ)(日本生化学工業株式会社)の分子量と比較した。図2にみられるように、本発明の突然変異株ストレプトコッカス・ズウエビデミカスLBF707により産生されたヒアルロン酸はもっとも高い分子量を有する。また粘度計を用いてLBF707によって産生されたヒアルロン酸と動物の組織から抽出された市販のヒアルロン酸製品であるヒルロン\*

\*およびアンビスク(AMVISC)(Jonsson & Johnson, USA)などの粘度を測定して比較した。図3にみられるように、本発明の突然変異株によるヒアルロン酸の極限固有粘度がもっとも高かった。各ヒアルロン酸製品の分子量はそれぞれの極限固有粘度からナルリン公式によって算出された。この結果、ストレプトコッカス・ズウエビデミカスLBF707によるヒアルロン酸の平均分子量は3,800キロダルトン、ヒルロンのものは3,700キロダルトンおよびアンビスクのものは3,100キロダルトンであった。

#### 【0026】実施例2 ウリジンを含む培地での菌株培養

5個の51発酵槽に下記組成の培養液をそれぞれ31ずつ注入した。培養液の組成は培養液11当たり60gのグルコース、1.0gの硫酸マグネシウム、2.0gの第一リン酸カリウム、5.0gの酵母エキスおよび15.0gの酵母ペプトンからなっている。ウリジンを培養液11 10当たり0、0.5、0.75、1.0および2.0gの量で発酵槽に添加した。前記培地を121℃で20分間高圧蒸気殺菌した後、ここにストレプトコッカス・ズウエビデミカス(ATCC 35246)の種培養液150mlを加えてpHは7.2、温度35℃、通気速度0.5vvmを保持しながら24時間好気培養した。培養の終了後各培養液中に残存するヒアルロン酸の濃度を測定し、その結果を表1に示した。下記表の結果から見られるように、ウリジンを加えることによりヒアルロン酸の産生量 20が増加した。

#### 【表1】

表1. ウリジン濃度によるヒアルロン酸の産生量

培地中のウリジンの濃度 (g/l)	0	0.5	0.75	1.0	2.0	5.0
(対照用)						
ヒアルロン酸の産生量 (g/l)	3.5	4.1	4.8	4.8	5.0	

#### 【0027】比較例3 培地中のウリジンの存在の有無によるヒアルロン酸分子量の比較

ウリジン濃度を0.75g/lに固定する以外は培地組成および培養条件を実施例2と同様にして培養を行った。培養の終了後、培養液中のヒアルロン酸の濃度は約4.8g/l程度であった。実施例2に対照用として用いたヒアルロン酸と本比較例から得られたヒアルロン酸 40の分子量を比較した。図4はウリジンの有無によって生成されたヒアルロン酸の濃度による粘度の変化(および極限固有粘度値)を示す。図4で、NH<sub>2</sub>-C<sub>tr</sub>lはウリジンが含まれていない培地を使用して得たヒアルロン酸(実施例2、対照群)を意味し、NH<sub>2</sub>-U<sub>ri</sub>dはウリジンを含む培地を使用して得たヒアルロン酸(本比較例、実験群)を意味する。対照群の極限固有粘度値は約3000ml/gであって、実験群の極限固有粘度値は約3,400ml/gである。この値を前述したナルリンの式によって分子量を求めると対照群の分子量は約 50

3000キロダルトンであって実験群の分子量は約3300キロダルトンであった。この結果から見られるように、培地にウリジンを添加することによりヒアルロン酸の分子量が増加した。

#### 【0028】実施例3 菌株のパッチ培養

51発酵槽に培養液11当たり60gのグルコース、1.0gの硫酸マグネシウム、2.0gの第一リン酸カリウム、5.0gの酵母エキス、15.0gの酵母ペプトン、および0.75gのウリジンを含む培養液31を注入した。前記培地を121℃で20分間高圧蒸気殺菌した後、ここに本発明のストレプトコッカス・ズウエビデミカスLBF707の種培養液150mlを加えて、pH 7.1~7.3、温度35℃~38℃、通気速度0.1~1.0vvmを保持しながら24時間培養した。培養の終了後、培養液中に存在するヒアルロン酸の濃度は6.0g/lであって、平均分子量は約3,500キロダルトンであった。

## 【0029】実施例4 菌株の流加培養

グルコースの濃度が40 g/lである以外は実施例3と同じ培地組成および培養条件で培養を行った。12~18時間後、培養液中のグルコース濃度が10 g/l以下に保持されるようにグルコースを添加する流加培養に転換した。培養液中のヒアルロン酸の濃度がそれ以上増大しなくなるまで24~36時間培養した。培養終了後、ヒアルロン酸の濃度は5.0 g/lであり、平均分子量は約3,500キロダルトンであった。

## 【0030】

【発明の効果】本発明はストレプトコッカス・ズウェビデミカスから得られた突然変異株を用いて高分子量ヒアルロン酸の大量産生を可能とするものであり、このような菌株を含むストレプトコッカス属の菌株をウリジンが添加された培地で培養することによって分子量がより大

きいヒアルロン酸を大量産生することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 ストレプトコッカス・ズウェビデミカス(ATCC 35246)と本発明のストレプトコッカス・ズウェビデミカスLBF707の発酵結果を比較して示すグラフである。

【図2】 本発明によって産生されたヒアルロン酸の分子量とストレプトコッカス・ズウェビデミカス(ATCC 35246)によって産生されたヒアルロン酸および市販品の分子量とを比較して示すグラフである。

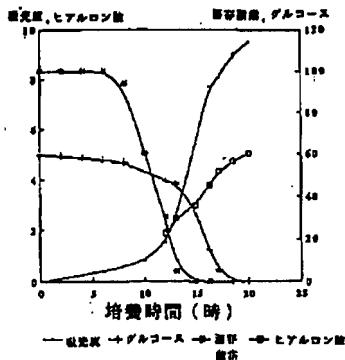
【図3】 本発明によって産生されたヒアルロン酸と先行技術により産生されたヒアルロン酸の濃度による固有粘度変化を比較して示したものである。

【図4】 ヒアルロン酸の固有粘度に対するウリジンの効果を示すグラフである。

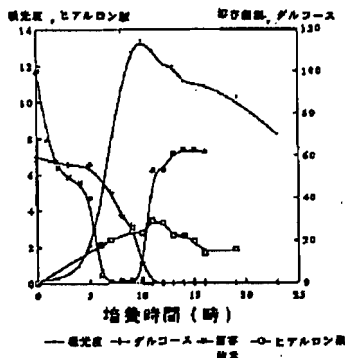
【図1】

発酵結果

## A. ストレプトコッカス・ズウェビデミカスLBF707

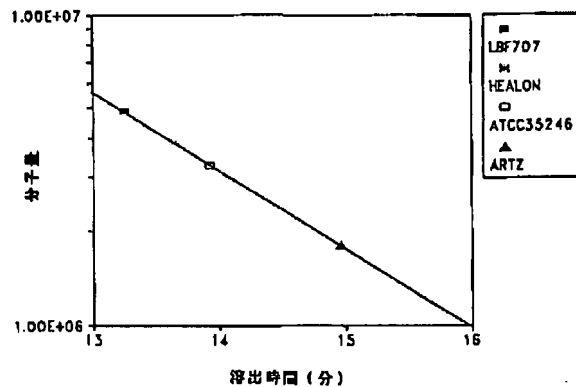


## B. ストレプトコッカス・ズウェビデミカス (ATCC 35246)



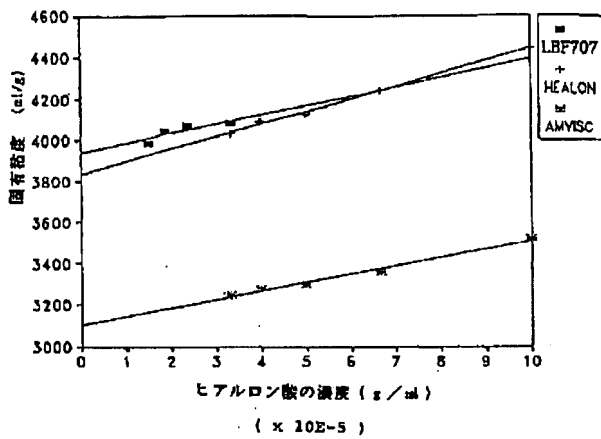
【図2】

HPLC流出時間による分子量の比較

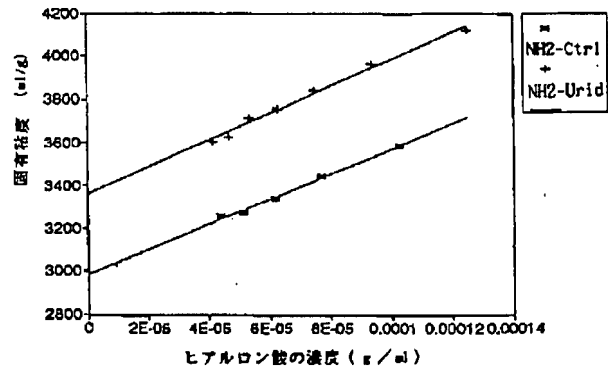


【図3】

ヒアルロン酸の固有粘度



【図4】

ヒアルロン酸の固有粘度に対する  
ウリジンの効果

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:46)

(72) 発明者 カン・ホワング

大韓民国デジョン、ユソング、ドリヨンド

ン381-42番 ラッキー・アパートメント

9-505